

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR 00/02193

ETU

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 AOUT 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIÈGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

<p><b>DATE DE REMISE DES PIÈCES</b>      <b>2 JUIL 1</b></p> <p><b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>      <b>9909 2</b></p> <p><b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT</b>    75      <b>75 INPI PARIS</b></p> <p><b>DATE DE DÉPÔT</b>      <b>29 JUIL 1999</b></p>	<p><b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b></p> <p style="text-align: center;">Cabinet ARMENGAUD AINE</p> <p style="text-align: center;">3, Avenue Bugeaud</p> <p style="text-align: center;">75116 PARIS</p> <p>n° du pouvoir permanent    références du correspondant    téléphone</p> <p style="text-align: right;">D.59837      01-45-53-05-50</p>						
<p><b>2 DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité    <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p style="text-align: center;">demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°    date</p> <p><b>Établissement du rapport de recherche</b>    <input type="checkbox"/> différé    <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance    <input type="checkbox"/> oui    <input checked="" type="checkbox"/> non</p> <p><b>Titre de l'invention</b> (200 caractères maximum)</p> <p style="text-align: center;">Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires</p>							
<p><b>3 DEMANDEUR (S)</b>    n° SIREN    code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p style="text-align: center;">CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</p> <p>Nationalité (s)    Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p style="text-align: center;">3 rue Michel Ange</p> <p style="text-align: center;">75794 PARIS CEDEX 16</p>	<p>Forme juridique</p> <p>Pays</p> <p style="text-align: center;">FRANCE</p>						
<p><b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs    <input type="checkbox"/> oui    <input checked="" type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p> <p><b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>    <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois    <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>							
<p><b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b></p> <table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:33%;">pays d'origine</td> <td style="width:33%;">numéro</td> <td style="width:33%;">date de dépôt</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">nature de la demande</p>		pays d'origine	numéro	date de dépôt			
pays d'origine	numéro	date de dépôt					
<p><b>7 DIVISIONS</b>    antérieures à la présente demande    n°    date    n°    date</p>							
<p><b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire)</p> <p>Mandataire : Chantal PEAUCELLE</p> <p>n° 92-1189</p> <p style="text-align: center;"><i>Peaucelle</i></p>	<p><b>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</b>    <b>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</b></p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p>						

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990 9862

**TITRE DE L'INVENTION:** Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés  
de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses  
immunitaires

**LE(S) SOUSSIGNÉ(S)** Madame PEAUCELLE Chantal

**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**GLAICHENHAUS Nicolas**

88 Bd Mantega Righi

06100 NICE

**MALHERBE Laurent**

736 Chemin des Ames du Purgatoire

Résidence le Goya

06560 VALBONNE

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 29 Juillet 1999

n° 92-1189

*[Signature]*

5

Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés  
de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans  
10 les réponses immunitaires.

L'invention se rapporte à des protéines  
recombinantes, et à des complexes moléculaires dérivés de  
15 ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les  
réponses immunitaires.

Elle concerne également une méthode de production  
de telles molécules et de tels complexes, ainsi que leurs  
applications, en particulier pour le diagnostic et en  
20 thérapeutique.

On connaît le rôle majeur, dans une réponse  
immunitaire, des molécules codées par le Complexe Majeur  
d'Histocompatibilité (CMH).

Ces molécules sont constituées de deux chaînes  
25 polypeptidiques : la chaîne lourde, et la chaîne légère.

Les molécules du CMH sont exprimées à la surface  
des cellules présentatrices (cellules dendritiques,  
lymphocytes B, macrophages) sous la forme de complexes  
moléculaires avec des peptides antigéniques, eux-mêmes  
30 dérivés de protéines extracellulaires ou intracellulaires.

La reconnaissance de ces complexes peptide/CMH par  
un récepteur spécifique exprimé à la surface des lymphocytes  
T est à l'origine de toute réponse immunitaire à médiation  
cellulaire.

---

5 Les molécules du CMH appartiennent à deux classes distinctes : celles de classe I, qui sont reconnues par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (cellules T cytotoxiques) et celles de classes II qui sont reconnues par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (cellules T auxiliaires).

10 Pour être utilisables comme sondes permettant de dénombrer et de mesurer la fréquence des lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné, de telles molécules et complexes doivent être produits sous forme soluble. Ces mêmes molécules et complexes solubles peuvent être utilisés  
15 pour moduler les réponses immunes.

La possibilité d'utiliser des molécules solubles du CMH pour détecter des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a été démontrée pour la première fois par Altman et al en 1996 (1). Depuis cette date, de nombreuses équipes ont utilisé cette  
20 stratégie pour dénombrer et caractériser le phénotype de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réagissant avec des peptides viraux, bactériens ou dérivés d'antigènes tumoraux. Toutefois, l'application de cette stratégie pour la détection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> s'est révélée problématique.

25 Dans la plupart des travaux publiés à ce jour, des systèmes d'expression bactériens ont été utilisés pour produire des molécules du CMH de classe I. Après incubation de ces molécules avec des peptides antigéniques, les complexes peptide/CMH ont été purifiés et obtenus sous forme  
30 de tétramères après incubation avec de la streptavidine. Cette dernière étape est rendue possible par l'addition à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne lourde du CMH d'un site de reconnaissance pour l'enzyme BirA, une enzyme bactérienne, qui est capable de catalyser l'addition d'une

---

5 molécule de biotine. D'autres équipes ont choisi de produire des dimères de molécules du CMH de classe I en utilisant le squelette d'un anticorps. Dans ce cas, la chaîne lourde du CMH a été liée à la chaîne lourde d'une immunoglobuline (Ig en abrégé) et la  $\beta$ -2-microglobuline liée à la chaîne légère.  
10 Les régions Fc des chaînes lourdes s'associant par l'intermédiaire de ponts disulfures, les molécules produites sont des dimères de molécules du CMH.

Pour des raisons techniques, la préparation de sondes moléculaires se fixant sélectivement aux lymphocytes  
15 T CD4<sup>+</sup> s'est avérée beaucoup plus difficile, vraisemblablement à cause de l'instabilité intrinsèque des molécules du CMH de classe II.

Des tétramères de molécules de classe II liées à un peptide antigénique, ou des dimères de ces molécules  
20 obtenus en utilisant le squelette d'un anticorps ont été produits.

Le problème de la stabilité et de l'affinité des récepteurs de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pour leur ligand est résolu, conformément à l'invention, par l'utilisation de  
25 constructions assurant la formation de dimères donnant des complexes multivalents grâce à l'utilisation de molécules comportant plusieurs sites de liaison pour certaines régions des dimères.

De telles constructions sont envisageables aussi  
30 bien pour des molécules de CMH de classe I que pour celles de classe II.

De manière avantageuse, de telles constructions sont suffisamment stables pour pouvoir être utilisées comme

---

5 sondes moléculaires ouvrant ainsi un large champ d'application.

Ces constructions sont également utilisables pour obtenir des analogues de récepteurs des cellules T capables de reconnaître spécifiquement de telles molécules.

10 L'invention a donc pour but de fournir des molécules recombinantes et des complexes recombinants correspondants, dans lesquels ces molécules sont associées à des peptides antigéniques, de grande stabilité et de forte affinité pour leur ligand.

15 Elle vise également leur production dans des cellules hôtes à l'aide de vecteurs d'expression appropriés.

L'invention vise en outre les applications immunologiques de ces complexes comme sondes moléculaires.

20 Les protéines recombinantes solubles selon l'invention sont constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II.

25 Ces dimères sont caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.

30 "Partie d'une région Fc" désigne un fragment correspondant à un fragment naturel, ou modifié par rapport à un tel fragment naturel, par substitution et/ou par délétion et/ou par mutation, mais capable de se lier à une protéine possédant des sites de liaison pour la région Fc, telle que la protéine A ou la protéine G.

L'expression "capable de se lier" est illustrée par l'exemple 1C.



5           La région Fc correspond plus spécialement à tout  
ou partie du domaine CH<sub>2</sub> et/ou CH<sub>3</sub>. Ce domaine peut être  
modifié par rapport au domaine naturel, mais doit être  
capable, conformément à l'invention, de se lier à une  
protéine du type protéine A ou G possédant plusieurs sites  
10 de liaison pour la région Fc d'une Ig.

L'immunoglobuline comportant la région constante  
visée ci-dessus peut être une IgG, notamment les isotypes  
IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, une IgM, une IgA, une IgD ou une  
IgE.

15           Les protéines de l'invention sont plus  
particulièrement caractérisées en ce qu'elles comportent  
tout ou partie des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  des molécules du CMH.

De manière avantageuse, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$   
constituant le dimère comportent des glissières à leucine,  
20 ce qui favorise leur appariement.

De telles glissières à leucine sont par exemple  
décrites par Scott et al (2) ou Kalandadze et al (3).

L'invention vise en particulier les molécules  
recombinantes associées en plusieurs dimères et notamment en  
25 tétramères et tout spécialement en octamères.

De telles molécules recombinantes sont complexées  
avec une protéine naturelle ou artificielle comportant  
plusieurs sites de liaison pour les régions constantes des  
immunoglobulines et permettant ainsi de créer des multimères  
30 de dimères. On citera à titre d'exemple la protéine A  
communément isolée à partir de *Staphylococcus aureus*, ou  
encore la protéine G de *Streptococcus* (groupe C), ou des  
multimères de récepteur des régions Fc obtenus par  
recombinaison génétique.

5 Les molécules recombinantes telles que définies ci-dessus complexées à des peptides antigéniques constituent des analogues de CMH.

L'invention vise de tels complexes, caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité  $-NH_2$  de la chaîne  $\beta$ ,  
10 un peptide antigénique fixé par l'intermédiaire d'un bras flexible. Ce bras peut avoir une longueur variable et permet le positionnement du peptide antigénique dans le sillon formé par le ou chaque dimère.

De telles fixations sont décrites par exemple par  
15 Kozono et al (4) et (5).

Les molécules définies ci-dessus sont obtenues avantageusement selon les techniques décrites dans les Manuels de Biologie Moléculaire pour la préparation des gènes recombinants et leur expression dans des cellules  
20 eucaryotes ou procaryotes. On se réfèrera ainsi par exemple aux ouvrages de Sambrook et al (6) ou de Ausubel et al (7).

Les séquences codant pour les fragments recombinants constitutifs des molécules définies ci-dessus sont introduites dans des vecteurs d'expression. On utilise  
25 généralement autant de vecteurs d'expression que de fragments. Mais il est également possible, en variante, d'utiliser un même vecteur pour plusieurs fragments.

Comme vecteurs d'expression, on utilisera avantageusement des plasmides et notamment des plasmides  
30 possédant un marqueur de sélection. Des résultats d'expression satisfaisants ont été ainsi obtenus avec des plasmides capables de se répliquer dans des bactéries et comportant, comme marqueur de sélection, un gène de résistance à un antibiotique.

---

5 Les promoteurs seront choisis de manière à  
permettre l'expression du gène recombinant dans le système  
d'expression utilisé. On citera à titre d'exemple le  
promoteur reconnu par la polymérase du bactériophage T4 ou,  
lorsqu'on utilise comme système d'expression des cellules de  
10 Drosophile, le promoteur du gène de la métallothionéine.

Comme systèmes d'expression eucaryote, on citera  
les systèmes baculovirus recombinants dans des cellules  
d'insecte, de cellules de Drosophile, des cellules de  
15 Hamster (lignée CHO) et des cellules de Singe (lignée COS).  
On peut également effectuer une expression dans des cellules  
de levure.

Comme systèmes d'expression procaryote, les  
bactéries sont largement utilisées, en particulier *E.coli*.

20 Les molécules recombinantes produites sont  
purifiées sur des colonnes d'immunoaffinité, notamment avec  
des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, spécifiques des  
molécules d'intérêt, ou encore avec des matériaux supports  
comme des billes, notamment des billes d'agarose.

25 D'autres protocoles de purification peuvent être  
envisagés. En particulier, par exemple lorsque les molécules  
à purifier comportent 6 résidus histidine consécutifs, des  
billes d'agarose recouvertes de nickel peuvent être  
utilisées pour purifier les molécules.

30 Les molécules purifiées obtenues sont alors mises  
à incuber avec les protéines possédant les sites de liaison  
pour la région Fc.

Ces protéines sont avantageusement marquées aux  
fins de détection, par exemple par un fluorophore.

---

5            Lorsque la molécule obtenue ne comporte pas de peptide antigénique, et qu'on souhaite disposer de complexes peptide antigénique/analogue de CMH, on la fait incuber avec ce peptide *in vitro*.

10           L'étude des molécules recombinantes selon l'invention a permis de mettre en évidence leur grande stabilité et une forte affinité dans les essais de reconnaissance immunologique.

            L'invention fournit ainsi des outils de grand intérêt pour la modulation des processus immunologiques.

15           Elle vise en particulier l'utilisation des complexes peptide antigénique/analogues de CMH de classe II pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules, c'est-à-dire déterminer ou identifier les  
20           molécules qu'elles sécrètent ou qu'elles expriment à leur surface. Cette détection est réalisée sur un prélèvement effectué sur un patient. Il peut s'agir d'un prélèvement sanguin, ou effectué sur des organes lymphoïdes secondaires, comme les ganglions lymphatiques, la rate, ou encore sur des  
25           tumeurs.

            Ces molécules peuvent avantageusement être utilisées pour dénombrer ou pour purifier ces cellules à partir de suspensions cellulaires comme décrit ci-dessus.

30           Alternativement, elles peuvent être utilisées pour visualiser ces cellules sur des coupes cellulaires.

            Il est ainsi possible de préciser le statut immunologique d'un individu.

---

5            Cette application revêt un grand intérêt pour le développement de vaccins contre certains agents pathogènes ou de vaccins anti-tumoraux.

10           On sait que pour juger de l'efficacité d'un vaccin, le meilleur moyen consiste à vacciner un grand nombre d'individus et à suivre le devenir de cette population lorsqu'elle est exposée à l'agent infectieux dans des conditions naturelles. Cette approche est toutefois difficile à cause notamment des coûts considérables qu'elle engendre, et de la difficulté de trouver suffisamment de  
15 volontaires.

            L'utilisation des complexes selon l'invention, en tant que sondes moléculaires se fixant sélectivement à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de spécificité donnée, permet de comparer rapidement l'efficacité de différentes préparations  
20 vaccinales et de déterminer le nombre et les intervalles optimaux entre les rappels.

            Dans une étude en pré-clinique, on inocule des individus avec des préparations vaccinales renfermant le ou les antigènes, puis on dénombre les cellules T présentes  
25 dans un prélèvement, réagissant avec des complexes selon l'invention. La réponse des individus permet d'apprécier la réaction vis-à-vis du peptide antigénique.

            Cette application peut être également mise en oeuvre comme moyens prédictifs quant à l'état d'un patient,  
30 en dénombrant et en déterminant le phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à risques.

            L'invention permet ainsi de déterminer le stade d'avancement de la maladie chez des patients souffrant de

---

5 maladies auto-immunes ou d'évaluer l'efficacité de certains traitements ou d'interventions thérapeutiques.

L'invention vise également l'application desdits complexes multivalents définis ci-dessus dans le diagnostic et la mise au point de traitements de maladies auto-immunes.

10 Un certain nombre de maladies auto-immunes sont dues à la mobilisation de lymphocytes T auto-réactifs qui provoquent la destruction des tissus de l'organisme. Dans certains cas, par exemple chez les diabétiques, le diagnostic de la maladie n'est effectué que tardivement  
15 lorsque les tissus sont déjà détruits. Pour empêcher la destruction des tissus, et bloquer le développement de la maladie, il est indispensable d'effectuer un diagnostic précoce. La possibilité de dénombrer, grâce à l'invention, les lymphocytes T auto-réactifs dans le sang des patients à  
20 risque constitue une avancée considérable.

Prenant en compte que les lymphocytes T auto-réactifs jouent un rôle déterminant dans le développement des maladies auto-immunes, de très nombreuses stratégies thérapeutiques visent à éliminer ces lymphocytes, ou à les  
25 empêcher d'exercer leur pouvoir pathogène, on mesurera l'intérêt de pouvoir dénombrer grâce à l'invention les lymphocytes T auto-réactifs dans le sang des patients traités, de comparer l'efficacité de différents traitements, et d'adapter le traitement en fonction de la réponse du  
30 malade.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'application des complexes pour l'enrichissement en un type de cellules T donné.

---

5            Cette application permet de disposer de grandes quantités de cellules T spécifiques d'un antigène donné *in vitro* à des fins de thérapie cellulaire. Ces cellules peuvent être en effet ré-inoculées à des patients à titre préventif ou curatif. On peut là encore dénombrer et  
10 déterminer, avant l'inoculation, le phénotype des cellules T complexées.

          L'invention vise encore l'application des molécules recombinantes multivalentes comme agents stimulants des cellules T.

15           Ces molécules peuvent être inoculées à un individu pour stimuler l'expansion et/ou l'activation de cellules T spécifiques d'un antigène donné en l'absence de toute autre cellule, en particulier de cellules présentatrices.

          Cette utilisation est donc intéressante pour  
20 stimuler des réponses immunitaires insuffisantes par exemple vis-à-vis de complexes CMH/antigène tumoral.

          Dans le cas de maladies infectieuses, on inocule *in vivo* les molécules recombinantes, le cas échéant après une étape de propagation préalable *ex vivo*.

25           D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés, à titre purement illustratif, dans les exemples qui suivent et en se référant aux figures 1 à 5, qui représentent respectivement

- la figure 1 représente la séquence de l'insert d'ADNc de  
30 la chaîne  $\alpha$  du CMH,

- la figure 2, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 1,

---

- 5 - la figure 3, la séquence de l'insert d'ADNc de la chaîne  $\beta$  du CMH,
- la figure 4, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 3,
- la figure 5, la construction plasmidique détaillée de la
- 10 figure 4, et
- la figure 6, un octamère peptide/CMH de classe II selon l'invention.

Exemple 1 : Production de complexes peptide/CMH de type II

- 15 1. Construction des plasmides recombinants
- . Construction de l'ADNc codant pour la protéine recombinante  $IA\alpha^d/Fc$  (clone 461) et insertion dans un plasmide

Cette construction est illustrée par la figure 1 qui donne la séquence d'ADNc, de la position 420 à 1940, et celle du peptide codé (437-1921) (SEQ ID N° 1). L'ADNc comprend, ligués entre eux, successivement, les fragments codant pour le peptide signal d' $IA^d$ ,  $IA^d\alpha$ , un linker, une glissière à leucine acide, un linker, une région

25 Hinge, la région  $CH_2$ , puis la région  $CH_3$  de Fc.

Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 2 et placée pour le contrôle d'un promoteur de métallothionéine inductible par  $CuSO_4$ .

- 30 . Construction de l'ADNc codant pour la protéine recombinante LACK/I-A  $\beta^d$ /glissière à leucine (clone 268) et insertion dans un plasmide



Cette construction est illustrée par la figure 3, qui donne la séquence d'ADNc, de la position 420 à 1370, et celle du peptide codé (440-1359) (SEQ ID N° 2)

L'ADNc comprend successivement les fragments, ligués entre eux, : codant pour une séquence leader,  $\beta 1$ , un peptide LACK (158-73), un linker, un site thrombine, un linker,  $IA\beta^d$  ( $\beta 1$ )  $IA\beta^d$  ( $\beta 2$ ), un linker, une glissière à leucine basique, un marqueur à motifs histidine.

Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 4, et détaillé sur la figure 5.

## 2. Transfection des plasmides dans des cellules de Drosophile

### 3. Sélection des transmettants stables

Les étapes 2 et 3 sont réalisées en opérant selon (6).

### 4. Production et purification des complexes

#### A) Production

On met en culture les cellules transfectées de Drosophile dans des flacons de 3 l, à 24°C, dans un milieu SFM Drosophile (GIBCO-BRL), supplémenté avec 1% de SVF (sérum de veau foetal).

Lorsque la densité cellulaire atteint  $5 \times 10^6$  cellules/ml, on induit la production de molécules LACK/IAd en ajoutant  $CuSO_4$  à la concentration finale de 1 mM, puis on soumet le milieu à incubation durant 5 à 6 jours.

On recueille les surnageants et, par centrifugation, on élimine les débris cellulaires (20 min, 10K, 4°C). Les surnageants sont ensuite transférés dans des tubes et à nouveau centrifugés.

5           On concentre les surnageants 8 à 10 fois en utilisant un concentrateur Prepscale<sup>R</sup> (Millipore, Inc.) On congèle à -70°C jusqu'à l'obtention de 500 ml de surnageants concentrés.

10   B) Purification

          On décongèle les surnageants à 37°C. On centrifuge 15 min à 10K. Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux tubes et à nouveau centrifugés 15 min à 10 K.

          On les charge alors sur une colonne  
15 d'immunoaffinité MK-D6 (volume de lit 5 ml), équilibrée au préalable dans un tampon A de 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0. La vitesse d'élution est de 10 à 20 ml/h.

          La colonne est lavée avec 30 ml de tampon A (6 fois le volume de lit) à 0,5 ml/min.

20           Pour l'élution, on utilise 15 ml de CAPS 50 mM pH 11,5 en opérant par gravité.

          On recueille 15 fractions de 1 ml chacune.

          Chaque fraction est neutralisée avec 300 µl de phosphate de sodium (200 mM, pH 6,2). On ajoute  
25 immédiatement des inhibiteurs de protéase (Complete<sup>R</sup>, Roche Diagnostics) dans chaque échantillon.

          On neutralise la colonne avec le tampon A.

          Pour éviter l'aggrégation des molécules de peptide/CMH, on effectue immédiatement une chromatographie  
30 par échange d'ions après l'élution.

          On détermine la concentration protéique de chaque fraction par électrophorèse en gel dénaturant.

5 Les fractions positives sont rassemblées et chargées sur colonne échangeuse d'ions (Mono Q) (Pharmacia Biotech).

On utilise un tampon B : Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 et un tampon C : Tris-HCl 20 mM pH 8,0 + 1M NaCl.

10 On opère selon les gradients suivants :

0-5 min : 0% C ; 5-20 min : 0-50% C ; 20-21 min : 50-100% C ; 21-25 min : 100% C ; 25-26 min : 100% C ; 26-30 min : 0%C.

15 Les molécules LACK/IA<sup>d</sup> éluent généralement à 30-36% en tampon C. On recueille les fractions correspondant au pic d'élution et on détermine la concentration protéique par électrophorèse en gel dénaturant.

Les fractions positives sont rassemblées et dialysées à 4°C contre 2 l de PBS, pH 7,4.

20 On change le tampon de dialyse 2 fois en 24 h. La concentration en protéines est déterminée selon le test BCA (Biorad). Les échantillons sont congelés à -70°C en petites fractions (8 µg). Les rendements sont de l'ordre de 0,5 mg/l de surnageant cellulaire.

## 25 C. Production de complexes multivalents (figure 6)

On prépare une solution de protéine A-couplée à un fluorophore constitué par Alexa 488<sup>R</sup> (sondes moléculaires # P-11047) à une concentration de 0,5 mg/ml dans PBS 1 X, pH 7,4. (Protéine A de Sigma)

30 Des aliquotes de 100 µl sont préparés et congelés à -20°C.

---

5 Un aliquote de molécule peptide/CMH (8  $\mu$ g) est  
décongelé et on ajoute 1,1  $\mu$ l de protéine A couplée au  
fluorophore Alexa. On soumet le mélange à incubation à  
température ambiante pendant 30 min, puis on ajoute un  
10 mélange PBS/ASB (albumine de sérum bovin) 0,1 % pour un  
volume final de 50  $\mu$ l. On ajoute 1  $\mu$ l de sérum de souris et  
on utilise directement le produit comme réactif de  
coloration.

#### D- Cytofluorométrie de flux

15 On purifie des cellules T à partir des ganglions  
lymphatiques d'une souris. On transfère  $10^6$  cellules dans un  
tube et on ajoute le réactif de coloration. Deux heures plus  
tard, les cellules sont lavées en tampon isotonique et  
analysées en cytofluorométrie de flux. La fréquence des  
cellules réagissant avec le réactif de coloration est  
20 déterminée par cette méthode.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ Altman et al, Science, volume 274, 4 octobre  
1996.
  - 2/ Scott et al, J. Exp. Med. 183:2087-2095, 1996.
  - 25 3/ Kalandadze et al, J Biol Chem. 271 (33) :  
20156-62, 1996.
  - 4/ Kozono et al, Nature. 369 : 151-153, 1994.
  - 5/ Kozono et al, Immunity. 3: 187-196, 1995.
-

5            6/ Sambrook et al, Molecular Cloning : second  
Edition (1989).

            7/ Ausubel et al, Current Protocols in Molecular  
Biology, Ed John Wiley and Sons, Inc., 1997.

---

5

## REVENDICATIONS

1/ Protéines recombinantes solubles, constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II, caractérisées en ce qu'elles comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.

2/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  des molécules du CMH.

15 3/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie du domaine CH<sub>2</sub> et/ou CH<sub>3</sub> de la région Fc.

20 4/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les chaînes qui constituent le dimère comportent des glissières à leucine.

25 5/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles sont associées en plusieurs dimères et notamment en tétramères ou en octamères.

6/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles sont complexées à des protéines naturelles ou artificielles, comportant plusieurs sites de liaison pour

---

5 les régions constantes des immunoglobulines, telles que la protéine A, la protéine G, ou des multimères de récepteur des régions Fc obtenus par recombinaison génétique.

7/ Protéines recombinantes solubles selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce  
10 qu'elles sont liées de manière covalente ou non covalente à un peptide antigénique.

8/ Protéines recombinantes solubles selon la  
revendication 7, caractérisées en ce que le peptide  
antigénique est fixé à l'extrémité amino-terminale de la  
15 chaîne  $\beta$  par l'intermédiaire d'un bras flexible.

9/ Séquences nucléotidiques possédant un cadre de  
lecture correspondant à tout ou partie d'une molécule selon  
l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10/ Vecteurs d'expression, notamment plasmides,  
20 caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence selon la revendication 9.

11/ Cellules procaryotes ou eucaryotes porteuses  
d'au moins un vecteur selon la revendication 10.

12/ Utilisation des molécules selon la  
25 revendication 7 ou 8, pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules.

13/ Utilisation selon la revendication 12, comme  
molécules immunostimulantes, notamment pour le développement  
30 de vaccins.

5           14/ Utilisation selon la revendication 12, comme  
moyen prédictif de l'état d'un patient pour dénombrer et  
déterminer le phénotype de cellules T autoréactives chez des  
malades à risques, ou à des fins thérapeutiques.

10           15/ Utilisation des molécules selon la  
revendication 7 ou 8, pour la purification et/ou  
l'enrichissement de lymphocytes T spécifiques d'un antigène  
donné, soit à partir de cultures cellulaires, soit à partir  
de prélèvements sur un patient.

15           16/ Utilisation selon la revendication 15,  
caractérisé en ce que les populations de lymphocytes T  
enrichies en un type de cellules T donné sont utilisées à  
des fins de thérapie cellulaire.

---



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; C. N. R. S.

&lt;120&gt; "Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires".

&lt;130&gt; CP/VB 973

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1484

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1482)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: ligation de fragments d'ADNc

&lt;400&gt; 1

atg	ccg	tgc	agc	aga	gct	ctg	att	ctg	ggg	gtc	ctc	gcc	ctg	aac	acc	48
Met	Pro	Cys	Ser	Arg	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Thr	
1				5					10					15		

atg	ctc	agc	ctc	tgc	gga	ggt	gaa	gac	gac	att	gag	gcc	gac	cac	gta	96
Met	Leu	Ser	Leu	Cys	Gly	Gly	Glu	Asp	Asp	Ile	Glu	Ala	Asp	His	Val	
			20					25					30			

ggc	ttc	tat	ggt	aca	act	gtt	tat	cag	tct	cct	gga	gac	att	ggc	cag	144
Gly	Phe	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Tyr	Gln	Ser	Pro	Gly	Asp	Ile	Gly	Gln	
		35				40						45				

tac	aca	cat	gaa	ttt	gat	ggt	gat	gag	ttg	ttc	tat	gtg	gac	ttg	gat	192
Tyr	Thr	His	Glu	Phe	Asp	Gly	Asp	Glu	Leu	Phe	Tyr	Val	Asp	Leu	Asp	
	50					55					60					

aag	aag	aaa	act	gtc	tgg	agg	ctt	cct	gag	ttt	ggc	caa	ttg	ata	ctc	240
Lys	Lys	Lys	Thr	Val	Trp	Arg	Leu	Pro	Glu	Phe	Gly	Gln	Leu	Ile	Leu	
65					70					75					80	

ttt	gag	ccc	caa	ggt	gga	ctg	caa	aac	ata	gct	gca	gaa	aaa	cac	aac	288
Phe	Glu	Pro	Gln	Gly	Gly	Leu	Gln	Asn	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	His	Asn	
			85					90						95		

ttg	gga	atc	ttg	act	aag	agg	tca	aat	ttc	acc	cca	gct	acc	aat	gag	336
Leu	Gly	Ile	Leu	Thr	Lys	Arg	Ser	Asn	Phe	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Glu	
		100					105						110			

gct	cct	caa	gcg	act	gtg	ttc	ccc	aag	tcc	cct	gtg	ctg	ctg	ggt	cag	384
Ala	Pro	Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Pro	Lys	Ser	Pro	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	
	115					120						125				

ccc	aac	acc	ctt	atc	tgc	ttt	gtg	gac	aac	atc	ttc	cca	cct	gtg	atc	432
Pro	Asn	Thr	Leu	Ile	Cys	Phe	Val	Asp	Asn	Ile	Phe	Pro	Pro	Val	Ile	
	130					135					140					

aac atc aca tgg ctc aga aat agc aag tca gtc aca gac ggc gtt tat	480
Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser Val Thr Asp Gly Val Tyr	
145 150 155 160	
gag acc agc ttc ctc gtc aac cgt gac cat tcc ttc cac aag ctg tct	528
Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His Ser Phe His Lys Leu Ser	
165 170 175	
tat ctc acc ttc atc cct tct gat gat gac att tat gac tgc aag gtg	576
Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Ile Tyr Asp Cys Lys Val	
180 185 190	
gag cac tgg ggc ctg gag gag ccg gtt ctg aaa cac tgg gaa cct gag	624
Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu Lys His Trp Glu Pro Glu	
195 200 205	
att cca gcc ccc atg tca gag ctg aca gaa act gga ggt gga gga tcc	672
Ile Pro Ala Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Ser	
210 215 220	
act aca gct cca tca gct cag ctc gaa aaa gag ctc cag gcc ctg gag	720
Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Glu	
225 230 235 240	
aag gaa aat gca cag ctg gaa tgg gag ttg caa gca ctg gaa aag gaa	768
Lys Glu Asn Ala Gln Leu Glu Trp Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu	
245 250 255	
ctg gct cag gca gca tct gag ccc aga ggg ccc aca atc aag ccc tgt	816
Leu Ala Gln Ala Ala Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys	
260 265 270	
cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac ctc ttg ggt gga cca tcc gtc	864
Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	
275 280 285	
ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat gta ctc atg atc tcc ctg agc	912
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser	
290 295 300	
ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gtg gat gtg agc gag gat gac cca gat	960
Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp	
305 310 315 320	
gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac gtg gaa gta cac aca gct cag	1008
Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln	
325 330 335	
aca caa acc cat aga gag gat tac aac agt act ctc cgg gtg gtc agt	1056
Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser	
340 345 350	
gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg atg agt ggc aag gag ttc aaa	1104
Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys	
355 360 365	
tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca gcg ccc atc gag aga acc atc	1152
Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile	
370 375 380	
tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct cca cag gta tat gtc ttg cct	1200
Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro	
385 390 395 400	

cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa cag gtc act ctg acc tgc atg	1248
Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met	
405 410 415	
gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att tac gtg gag tgg acc aac aac	1296
Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn	
420 425 430	
ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac act gaa cca gtc ctg gac tct	1344
Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser	
435 440 445	
gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag ctg aga gtg gaa aag aag aac	1392
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn	
450 455 460	
tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt tca gtg gtc cac gag ggt ctg	1440
Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu	
465 470 475 480	
cac aat cac cac acg act aag agc ttc tcc cgg act ccg ggt aa	1484
His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly	
485 490	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 921

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: Ligation  
de fragments d'ADNc

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(921)

&lt;400&gt; 2

atg gct ctg cag atc ccc agc ctc ctc ctc tca gct gct gtg gtg gtg	48
Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Val Val	
1 5 10 15	
ctg atg gtg ctg agc agc ccc ggg act gag ggc gga aac tcc atc tgc	96
Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Gly Thr Glu Gly Gly Asn Ser Ile Cys	
20 25 30	
ttc tcg ccg tcg ctg gag cac ccg atc gtg gtg tcc ggc agc tgg gac	144
Phe Ser Pro Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp	
35 40 45	
gga ggt ggg ggc tca cta gtg ccc cga ggc tct gga ggt gga ggc tcc	192
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
50 55 60	
gaa agg cat ttc gtg gtc cag ttc aag ggc gag tgc tac tac acc aac	240
Glu Arg His Phe Val Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn	
65 70 75 80	
ggg acg cag cgc ata cgg ctc gtg acc aga tac atc tac aac cgg gag	288
Gly Thr Gln Arg Ile Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu	
85 90 95	
gag tac gtg cgc tac gac agc gac gtg ggc gag tac cgc gcg gtg acc	336
Glu Tyr Val Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr	

100	105	110	
gag ctg ggg cgg cca gac gcc gag tac tgg aac agc cag ccg gag atc 384			
Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile			
115	120	125	
ctg gag cga acg cgg gcc gag gtg gac acg gcg tgc aga cac aac tac 432			
Leu Glu Arg Thr Arg Ala Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr			
130	135	140	
gag ggg ccg gag acc agc acc tcc ctg cgg cgg ctt gaa cag ccc aat 480			
Glu Gly Pro Glu Thr Ser Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn			
145	150	155	160
gtc gcc atc tcc ctg tcc agg aca gag gcc ctc aac cac cac aac act 528			
Val Ala Ile Ser Leu Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr			
165	170	175	
ctg gtc tgt tcg gtg aca gat ttc tac cca gcc aag atc aaa gtg cgc 576			
Leu Val Cys Ser Val Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg			
180	185	190	
tgg ttc agg aat ggc cag gag gag aca gtg ggg gtc tca tcc aca cag 624			
Trp Phe Arg Asn Gly Gln Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Thr Gln			
195	200	205	
ctt att agg aat ggg gac tgg acc ttc cag gtc ctg gtc atg ctg gag 672			
Leu Ile Arg Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu			
210	215	220	
atg acc cct cat cag gga gag gtc tac acc tgc cat gtg gag cat ccc 720			
Met Thr Pro His Gln Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro			
225	230	235	240
agc ctg aag agc ccc atc act gtg gag tgg agg gca cag tcc gag tct 768			
Ser Leu Lys Ser Pro Ile Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser Glu Ser			
245	250	255	
gcc cgg agc aag gga ggt gga gga tcc act aca gct cca tca gct cag 816			
Ala Arg Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln			
260	265	270	
ttg aaa aag aaa ttg caa gca ctg aag aaa aag aac gct cag ctg aag 864			
Leu Lys Lys Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Asn Ala Gln Leu Lys			
275	280	285	
tgg aaa ctt caa gcc ctc aag aag aaa ctc gcc cag cat cat cat cat 912			
Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu Ala Gln His His His His			
290	295	300	
cat cat tga 921			
His His			
305			

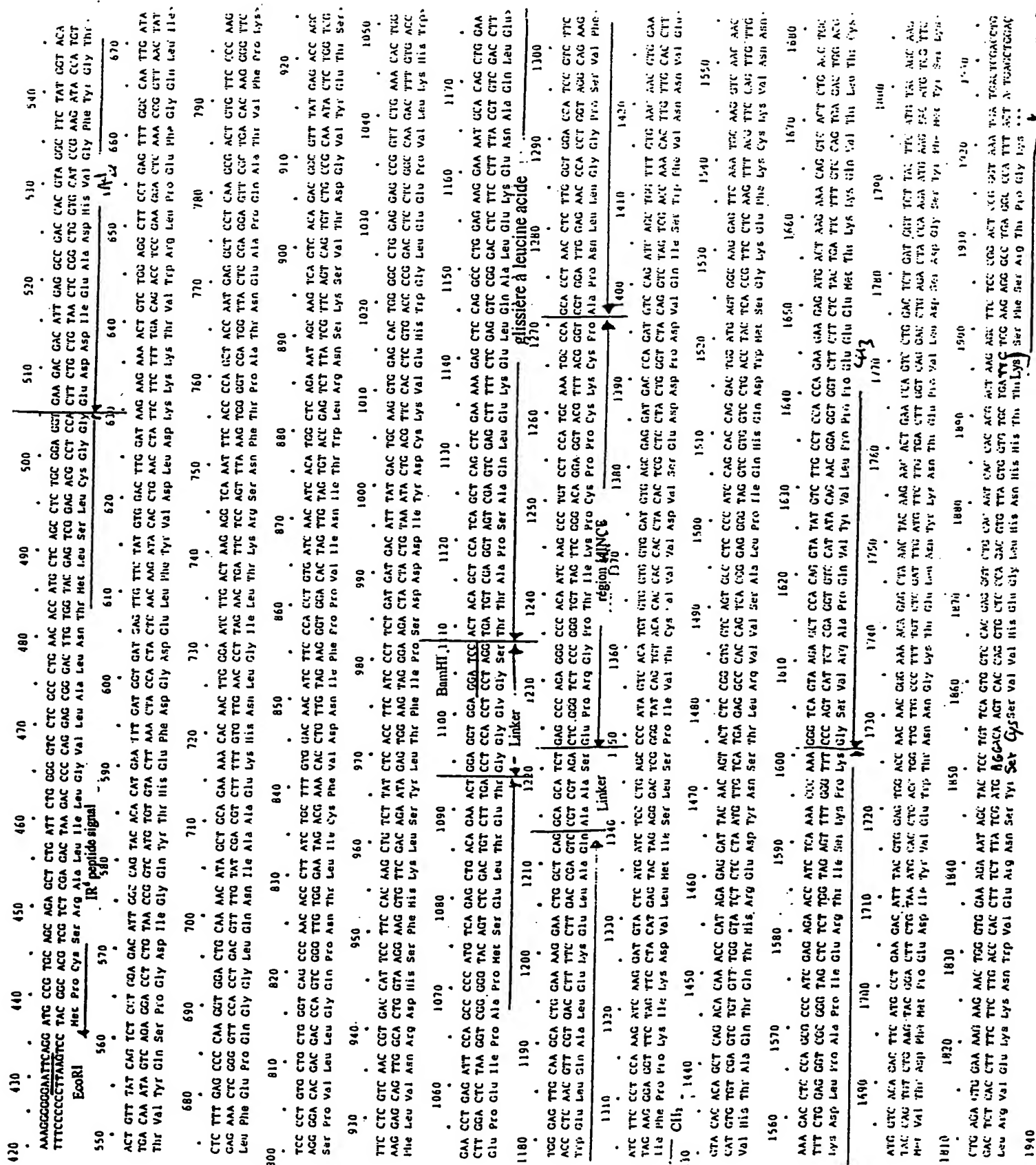


FIGURE 2

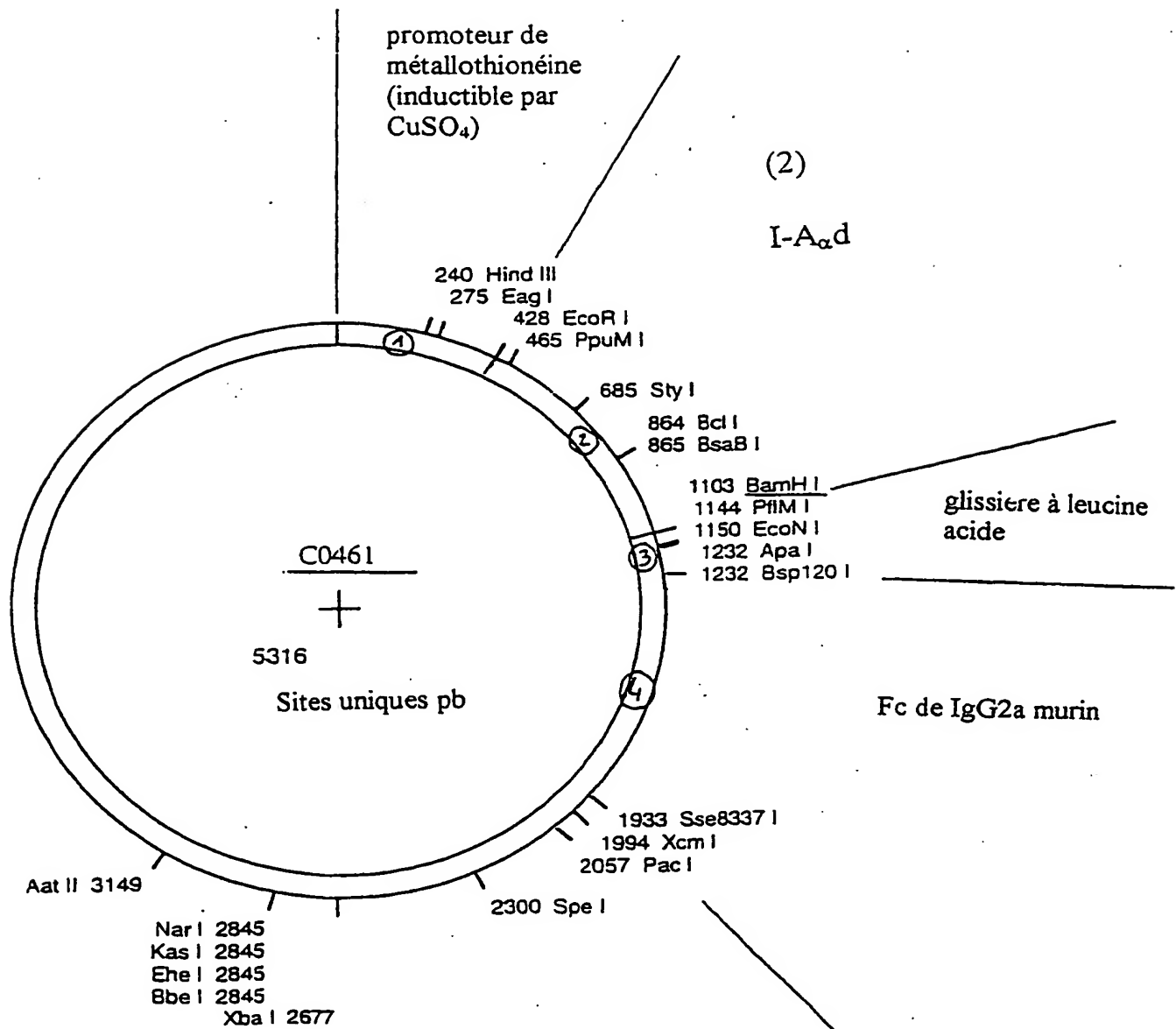


FIGURE 3

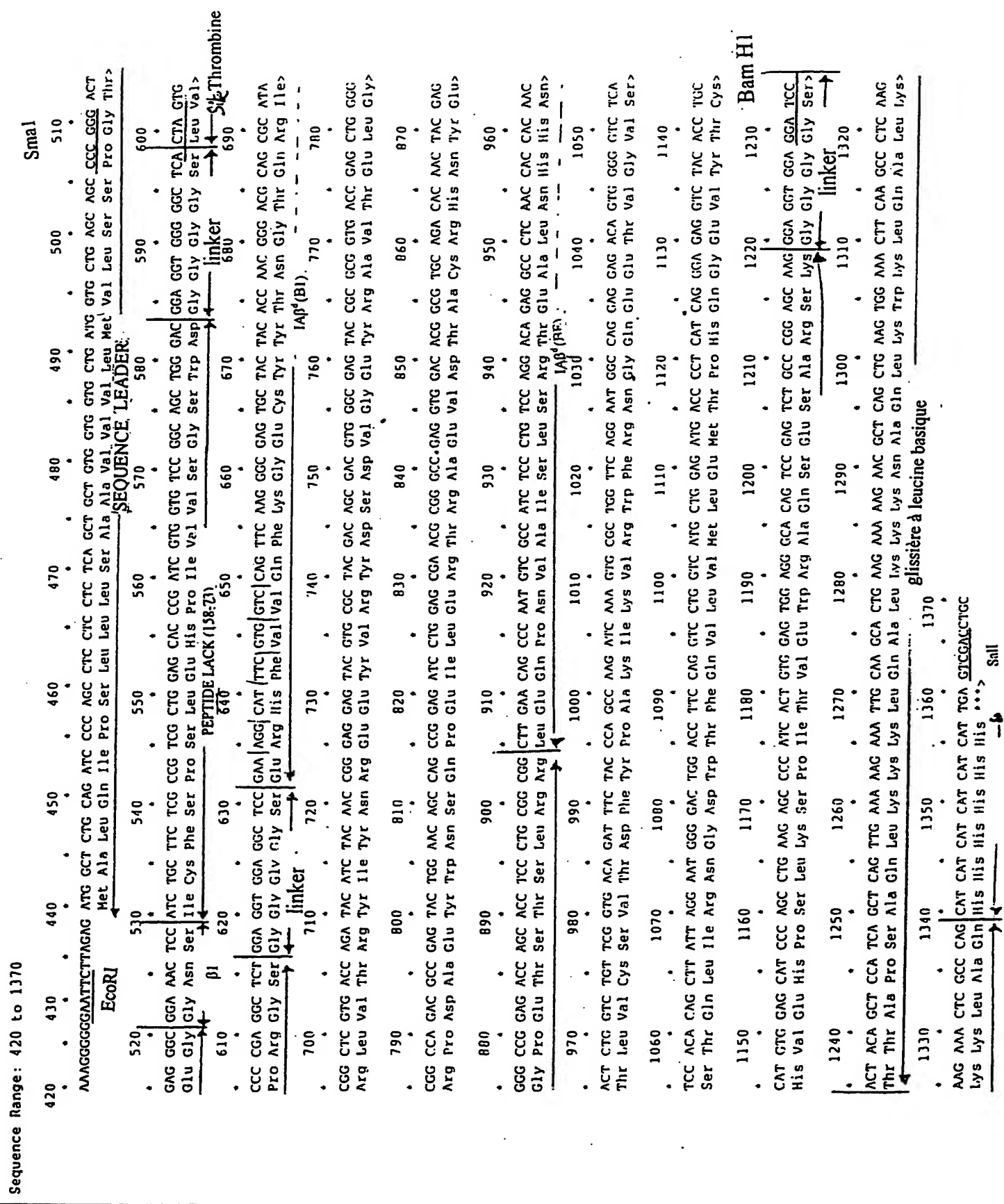


FIGURE 4

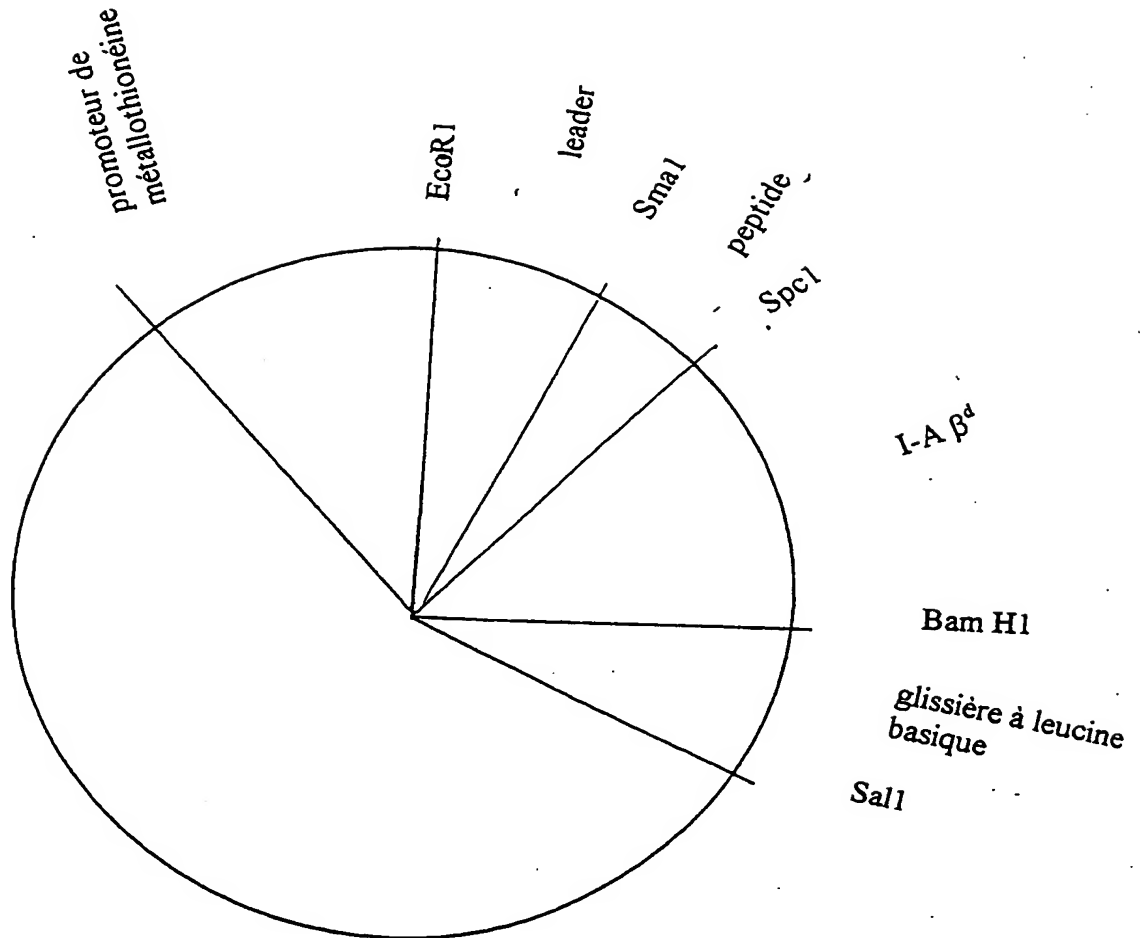




FIGURE 5

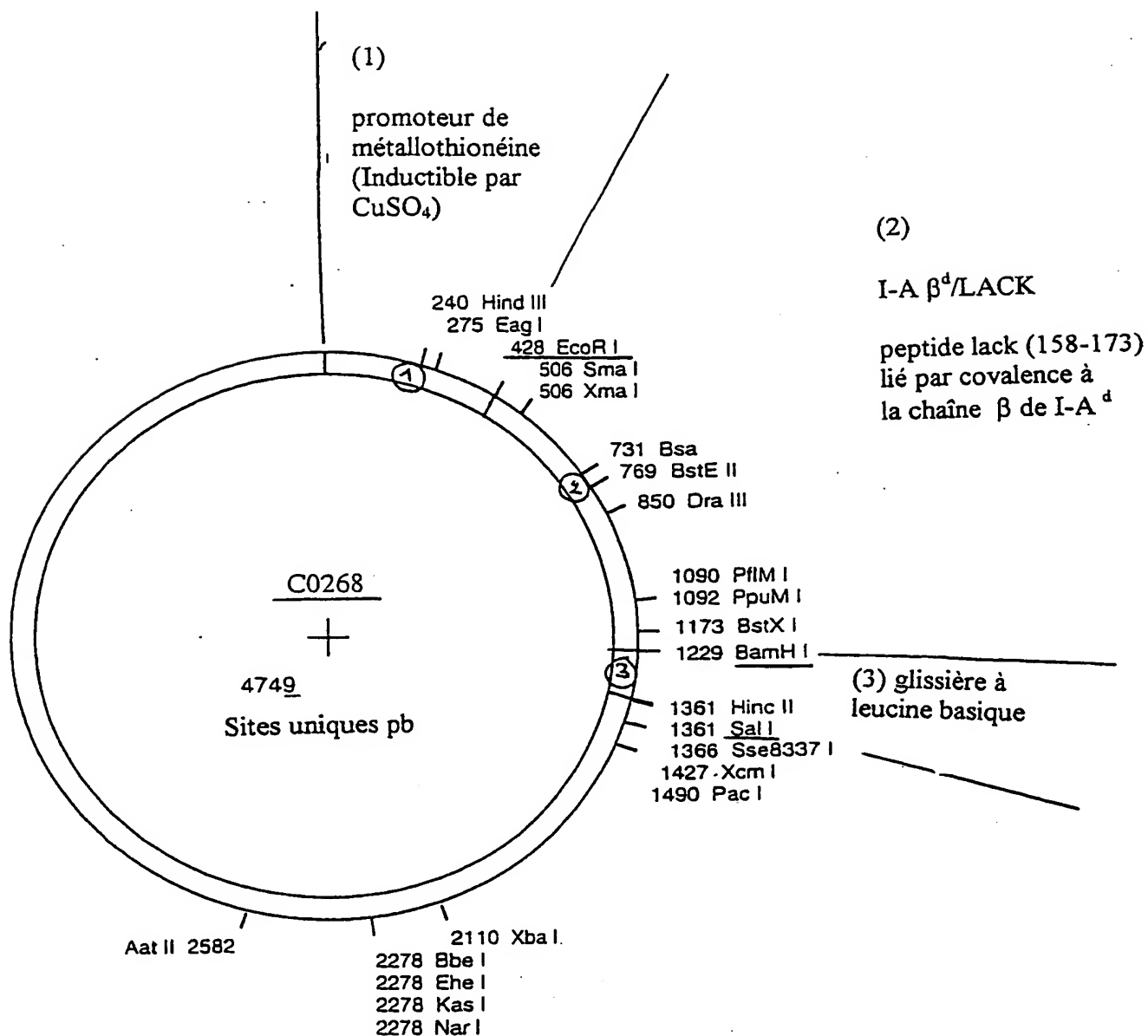


FIGURE 6

